

【総説】

MAPKシグナルに異常を認める腫瘍に対する分子標的治療開発

Treatment strategies targeting cancers harboring mutations in MAPK signaling.

金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科研究分野

衣 斐 寛 倫

はじめに

MAPK(Mitogen-activated Protein Kinase)は、酵母からヒトに至るまで全ての真核生物に保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、そのシグナルは細胞外の様々な刺激を核内へと伝達するカギとなっている。ヒトではERKシグナル、p38シグナル、JNKシグナルの少なくとも3種類のMAPKシグナルが存在するが、その中でERKシグナルは主に増殖因子によって活性化され、細胞増殖や分化を制御する。KRASおよびBRAFタンパクは、ERKシグナル伝達系に属しており、両者の遺伝子に変異が生じると、産生された異常タンパクは正常細胞を形質転換(がん化)させる事が明らかとなっている(図1)。がんの発生・進展において直接的に重要な役割を果たす遺伝子はドライバー遺伝子変異と呼ばれるが、このようにRAS、RAF遺伝子変異はドライバー遺伝子変異と考えられている。RASタンパクはKRAS, HRAS, NRASにより構成され、3つのアイソフォームは相同性が高く立体構造もほぼ同じである。一方で、KRAS遺伝子変異が様々な腫瘍で認められるのに対し、HRAS, NRASの変異は低頻度である。また、RAFタンパクはRASの下流に位置し、ARAF, BRAF, CRAFにより構成されるが、遺伝子変異のほとんどはBRAFに発生する。本稿では、主にKRAS遺伝子変異腫瘍およびBRAF遺伝子変異腫瘍に対する治療開発について概説する。

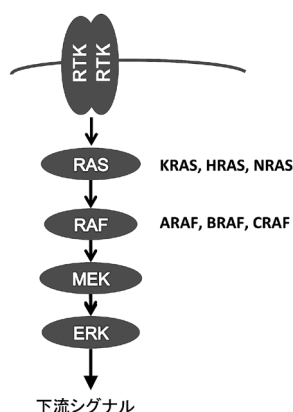


図1. MAPKシグナルのうちERK経路。受容体(Receptor Tyrosine Kinase, RTK)は細胞外からの様々な刺激を受け活性化し、そのシグナルを下流に伝える。

BRAF変異腫瘍に対する治療戦略

1. 変異BRAFによるMAPKシグナルの活性化

BRAF変異は、メラノーマ(80-90%)、甲状腺がん(60%)、大腸がん(10%)、非小細胞肺癌(6%)などに認められ人種差も示唆されている(本稿では欧米人における頻度を記載)。BRAF変異のほとんどはキナーゼドメインに発生し、特に600番目のアミノ酸であるバリリン(BRAF V600)周囲の活性化ループ(A-loop)近辺、もしくは464-469番目のアミノ酸が構成するphosphate-binding loop(P-loop)に高頻度で認められる。BRAFタンパクの活性はA-loopとP-loopの結合状態により規定されるが、変異BRAFタンパクにおいてはA-loopとP-loop間の結合が阻害されるため、その活性が変化する。活性化変異の代表はV600変異であり、キナーゼ活性が500倍程度上昇する。BRAF V600変異タンパクは単量体で存在し、直接下流シグナルを活性化する。一方、V600以外のA-loopとP-loopにおける変異(non V600変異)では、部位によりBRAFキナーゼ活性が数倍~50倍程度上昇するもの(intermediate型)に加え、活性がむしろ低下するもの(impaired型)が存在する。Intermediate型では、変異BRAFは野生型BRAFと二量体を形成し下流シグナルを活性化する。Impaired型は、変異BRAFのキナーゼ活性自体は低下しているが、野生型BRAF, CRAFと二量体を形成することにより、二量体としての活性を上昇させている。これらの機構によりそれぞれERKシグナルを活性化させ細胞のがん化を誘導している(1)。

2. BRAF V600変異を有するメラノーマに対する治療開発

BRAF V600変異タンパクに対する特異的キナーゼ阻害薬として、ベムラフェニブ、ダブラフェニブが開発された。BRAF V600変異はメラノーマで高頻度に認められることから、化学療法歴のないBRAF V600変異を有する根治切除不能なⅢ期/Ⅳ期のメラノーマ患者675人を対象に標準治療薬であるダカルバジンとの比較第Ⅲ相試験が行われた(2)。その結果、無増悪生存期間は、ダカルバジン群で1.6か月(95%信頼区間:1.6-2.1)、ベムラフェニブ群で6.9か月(95%信頼区間:6.1-7.0)とベムラフェニブ群で有意に良好(ハザード比0.38, $P<0.0001$)であり、全生存期間についてもダカルバジン群で9.7か月(95%信頼区間:7.9-12.8)、ベムラフェニブ群で13.6か月(95%信頼区間:12.0-15.2)と有意に良好(ハザード比0.70,

P=0.0008)であった。奏効率はダカルバジン群5.5% (95%信頼区間: 2.8-9.3) に対し、ベムラフェニブ群では48.4% (41.6-55.2) であった (P<0.0001)。本試験の結果をもってベムラフェニブは本邦を含め承認された。

3. BRAF V600変異を有する腫瘍における臓器特異性

ベムラフェニブがメラノーマで奏効したことから、BRAF V600変異を有する他臓器でもベムラフェニブの効果が検討された。しかし、大腸がんの第一相試験では17人中1人の奏効を認めたのみであった。その理由の一つは、BRAF阻害によるMAPKシグナルの抑制が、フィードバック機構を誘導し受容体キナーゼの活性化をきたすためである。筆者らは、大腸がんにおいて、BRAF阻害がフィードバック機構の誘導によりEGFRの活性化を惹起し、MAPKシグナルを再活性化することを示した(3,4)。BRAF阻害薬とEGFR阻害薬の併用は、MAPKシグナルを完全に遮断し、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導した。また、甲状腺がんではBRAF阻害によるフィードバック機構はERBB3およびリガンドであるneuregulinの発現誘導を惹起する(5)。従って、同じBRAF V600変異を有する腫瘍であっても、腫瘍の発生母地によるシグナル伝達の違いを考慮する必要がある(図2)。現在、BRAF V600変異を有する大腸がんに対しては、基礎検討で得られた結果をもとに、抗EGFR抗体薬とBRAF阻害薬(±MEK阻害薬)の臨床試験が進行中である。第一相試験では3剤併用の奏効率は20%前後であり、現在第三相試験が計画されている。ただし、EGFRとBRAFを同時に阻害した場合でも、BRAF変異大腸がんの治療成績はメラノーマと比較し十分でないことから、さらなるシグナル伝達系の関与などの検討が必要である。

4. BRAF阻害薬のパラドックス

メラノーマにおけるベムラフェニブの副作用として皮膚扁平上皮がんおよび角化棘細胞腫の発生が認められた。また、これらの腫瘍の60%程度にRAS変異が認められ、その多くがHRASの変異であった。その理由としては、ベムラフェニブはBRAF V600に対する特異的キナーゼ阻害薬であるが、高濃度では野生型BRAFに対する阻

害活性も存在する。細胞内では野生型のBRAF・CRAFはホモ・ヘテロ二量体を形成し互いの活性を抑制しているが、BRAF阻害薬が二量体を形成した野生型RAFの一方に結合すると、もう一方に対する抑制効果が消失し、上流のRASタンパクよりシグナルが伝達されRAF二量体の活性が亢進する。これはparadoxical activationと呼ばれ、変異RASタンパクの存在下ではBRAF阻害薬の投与によりMAPKシグナルがむしろ活性化することから、皮膚がんの発生につながったと考えられている。

5. BRAF阻害薬の獲得耐性機構

ベムラフェニブの奏効率は、それまでの標準薬であったダカルバジンの奏効率と比べ驚異的とも言えた。しかしながら、その効果は永続的なものではなく多くの症例で半年から一年程度で治療抵抗性となることから、耐性メカニズムが精力的に調べられている(6)。現在判明している耐性メカニズムの多くは、MAPKシグナルの再活性化に関与している。まず、RAFの上流であるNRASの変異または細胞膜受容体の活性化が報告された。またBRAFのアイソフォームであるCRAFの過剰発現も下流の活性化につながる。さらに、耐性株および検体を用いた解析から、BRAF遺伝子変異に加えスプライス異常が発生することで、RAS結合部位を欠失したBRAFタンパク(p61-BRAF V600)が同定されている。この欠失型BRAFタンパクは二量体形成が亢進することが明らかとなっており、二量体となった変異BRAFが下流シグナルを活性化する。RAFの下流に関しても、MEK遺伝子変異によるERKシグナルの常時活性化やCOTタンパクの活性化によりERKが活性化することが知られており、そのメカニズムは多岐にわたる。MAPKシグナルの再活性化とは無関係な耐性メカニズムとして、MAPKシグナル以外の生存に重要なシグナルの活性化が示唆されており、PTENの欠失・変異やRB1の不活性化が報告されている。興味深いことに、EGFR変異肺がんなどで認められるゲートキーパー変異(二次性変異)はBRAF遺伝子には認められない。

6. BRAF阻害薬とMEK阻害薬の併用療法

上述のごとく、BRAF阻害薬の獲得耐性の多くはMAPKシグナルの再活性化を引き起こす。MAPKシグナルの再活性化を抑制し耐性を克服する目的でBRAF阻害薬とMEK阻害薬の併用療法が検討された(7)。メラノーマにおいてMEK阻害薬コビメチニブとベムラフェニブの併用療法は、ベムラフェニブ単独と比較し、無増悪生存期間において、ベムラフェニブ群で7.2か月(95%信頼区間: 5.6-7.5)、ベムラフェニブ/コビメチニブ併用群で12.3か月(95%信頼区間: 9.5-13.4)と併用群で有意に良好(ハザード比 0.58, P<0.0001)であり、全生存期間についてもベムラフェニブ群で17.4か月(95%信頼区間: 15.0-19.8)、ベムラフェニブ/コビメチニブ併用群で22.3か月(95%信頼区間: 20.3-未到達)と有意に良好(ハザード比 0.70, P=0.005)であった。また、MEK阻害によりMAPKシグナルのパラドックス活性化が抑制されることから、皮膚がんの発生も減少を認めた。現在、本邦ではメラ

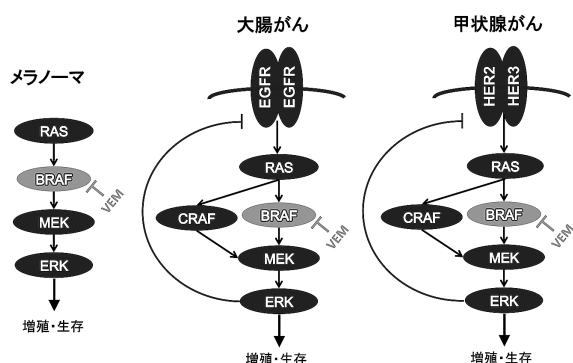


図2. BRAF V600変異腫瘍における、BRAF阻害が引き起こすフィードバック機構のがん種による違い。VEM: ベムラフェニブ

ノーマに対しMEK阻害薬トラメチニブとベムラフェニブの併用療法が承認されている。

7. BRAF non V600変異に対する治療戦略

現在認可されているBRAF阻害薬はV600変異に対する特異的阻害薬のため、BRAF non V600変異を有するBRAF変異腫瘍に対しては無効である。従って、non V600変異腫瘍に対しては、下流シグナルであるMEKの阻害薬が有効と考えられる。この際にはV600変異と同様、フィードバック機構の存在も考慮する必要があると考えられる。

KRAS変異腫瘍に対する治療戦略

KRAS遺伝子変異について

KRAS遺伝子変異は、最も初期に発見されたがん遺伝子の一つであることから、疫学的な知見が集積している。KRAS遺伝子変異は全がんの20%程度に認められるが、特に難治性がんである膵臓がんの約90%、肺腺がんの約10%、大腸がんの約40%に認められる。肺がんでは、KRAS遺伝子変異は通常腺がんに発生し、扁平上皮がんでは頻度が低く、小細胞がんではほとんど認められない。また、人種差を認め、欧米人では腺がんの20-30%に変異を認めるのに対し、日本人では10%前後と低いことが明らかとなっている。その理由として、日本人ではEGFR遺伝子変異の頻度が高く、通常ドライバー遺伝子変異は相互排他的であることから、KRAS遺伝子変異症例が少ないと考えられている。膵がんではほとんどの変異がKRASエクソン2に存在するコドン12のグリシン(G)の変異に発生し、肺がんにおいても同様である。膵がんでは、G12V(バリリン(V)への変異)とG12D(アスパラギン酸(D)への変異)が多く、肺がんではこれに加えてG12C(システイン(C)への変異)も多く認められる。一方、これらのがん種では、大腸がんでは好発するコドン13やエクソン3のコドン61の変異は比較的少なく、発生母地による変異部位の違いが認められる。KRAS遺伝子変異と予後、治療効果予測については多数の報告があるが、確定的な結論には至っているものは少ない。その中では、大腸がんにおいて、KRAS遺伝子変異症例では抗EGFR抗体が無効であることが知られている。

がん細胞における変異KRASタンパクの果たす役割

KRASタンパクは正常細胞にも存在し、GDP結合時には不活性型である。GTPの結合により活性化されたRAS-GTPはRASGAPと呼ばれるタンパクにより速やかに不活性型のRAS-GDPへと変換される。しかし変異KRASタンパクはRASGAPによる不活化に抵抗性となっており常にRAS活性が維持された状態となっている(図3)。活性化KRASは多数の下流タンパクにシグナルを伝達し、その多くが細胞の増殖・生存に関わっている(図3)。

KRASの変異部位による機能の違いについては、いまだ不明な点が多いが、KRAS G12DがPI3Kシグナル、MAPKシグナルを活性化するのに対し、KRAS G12C、G12V変異ではRalシグナルを活性化することにより生存を維持するとしての報告もある(8)。

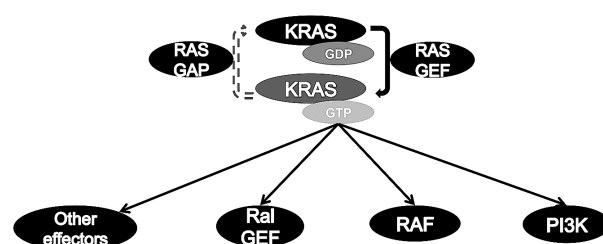


図3. 変異KRASにより制御されるシグナル伝達系。主にRAF-MEK-ERKシグナル、PI3Kシグナル、Ralシグナルが知られているが、これ以外にも20以上の下流シグナルを制御していると考えられている。これらのシグナル伝達系により、複数の生存シグナルやアポトーシスタンパクが制御されており癌細胞の生存維持、アポトーシスに対する抵抗性が維持されている。

変異KRASを標的とする治療

1. 変異KRASの直接阻害

BRAF V600変異腫瘍に対しBRAFキナーゼ阻害薬が効果を示す一方で、KRAS変異腫瘍に対してはいまだに有効な治療が開発されていない。その理由のひとつとして、現在臨床応用されている低分子化合物がキナーゼを阻害する薬剤であるのに対し、変異KRASタンパクの抑制にはGTP活性の抑制が必要があることがある。KRASタンパクとGTPの結合は非常に強力なため、両者の結合を阻害する薬剤の開発は難航している。最近になり、G12Cを有する変異KRASタンパクが、活性と不活性の状態を循環し続けていることが明らかとなった。このことを利用し、GDP-KRAS(不活性型)変異部位に共有結合し非可逆的に分子を不活化する化合物が開発され、*in vitro*の実験ではシグナル伝達と腫瘍細胞の増殖を抑制することが示された。これまで困難とされていた直接阻害薬の開発に一步近づいたとは言えるが、KRAS活性の阻害には高濃度が必要であるなど、実用化には依然としてかなりのハードルがあるものと考えられている。

2. ファルネシル転移酵素阻害薬

RASタンパクが機能するにはファルネシル転移酵素によりC末端のファルネシル化を受けることが必須であることから、1990年代にファルネシル転移酵素阻害薬が多数臨床試験された。しかし、ファルネシル転移酵素の阻害を行っても、KRASタンパクはゲラニル転移酵素により同様の修飾をうけることから、ファルネシル転移酵素阻害薬の開発はいずれも失敗に終わっている。

3. 変異KRASの下流を標的とした治療開発

MEK阻害薬

上記のようにKRASを直接阻害する標的薬の開発は進んでいない。このため、KRASの下流に存在する重要な生存シグナルを阻害し腫瘍細胞死を誘導する治療開発が進められている。RASは多数の下流シグナルの活性化を行うが、その中でもMAPKシグナルが最も主要なシグナルと考えられ、複数のMEK阻害薬が開発されている。しかしながら、MEK阻害薬の臨床試験はKRAS遺伝子変異を有するいずれのがん種に対しても単剤では有効性を示していない。例えば、セルメチニブはMEKタンパクに対

しアロステリック阻害によりキナーゼ活性を抑制する。一次もしくは二次治療不応例の非小細胞肺癌患者を対象としたセルメチニブと標準治療薬であるペメトレキセドを比較した第二相試験においては、無増悪生存期間は67日対90日、ハザード比1.08、両側80%信頼区間0.75-1.54、 $p=0.79$ と差を認めなかった。セルメチニブが臨床試験で効果を示せなかったことは細胞株等の実験からも裏付けられる。*KRAS*変異肺癌細胞株において、セルメチニブの投与は細胞増殖抑制を認めるが細胞死の誘導は認められない。このためマウスに腫瘍を移植したモデルにおいても増殖抑制は認めるが腫瘍の縮小を達成することはできない。また、セルメチニブの投与はフィードバック機構によりMEK自体のリン酸化を上昇させることが判明しており、このためERKシグナルの完全な抑制をきたすことができないと考えられる。

トラメチニブはセルメチニブ同様MEKタンパクに対しアロステリック阻害によりキナーゼ活性を抑制する低分子化合物であるが、セルメチニブに比べフィードバック機構によるMEKタンパクの活性上昇をきたしにくいことが知られている(9)。肺癌の二次治療として行われた、標準治療薬ドセタキセルとのランダム化第二相比較試験では、無増悪生存期間に差を認めなかったものの、86例中10例に部分奏功を認め奏効率は12%であった(10)。トラメチニブは*KRAS*変異肺癌細胞株において十分な細胞死を誘導することはできないが、セルメチニブより低用量でERKシグナルを抑制する。これらのことはトラメチニブ単剤では腫瘍縮小を達成する可能性が小さいものの、トラメチニブの方が併用療法を行う上では有利である可能性を示している。

MEK阻害薬を用いた併用療法

上記のように、MEK阻害薬単剤治療は*KRAS*変異肺癌に対して十分な効果を認めなかったことから、併用療法が試みられている。

PI3K阻害薬とMEK阻害薬の併用療法

*KRAS*の下流シグナルのうち、PI3KシグナルはMAPKシグナルと並び重要なシグナルと考えられている。このためPI3K阻害薬とMEK阻害薬の併用療法が検討され、*KRAS*変異肺癌モデルマウスでは著明な効果を示した(11)。これを受け、両阻害薬の併用第一相試験が多数行われているが、いずれも思わしい成果を上げていない(12)。その理由としては、両パスウェイは正常細胞の生存にも密接に関わっていることから、薬剤による完全な遮断は重篤な副作用を引き起こし実現不可能と考えられるためである。実際、最大耐容量を投与された患者の腫瘍組織を生検したところ、両シグナルはほとんどの検体で残存していた。

フィードバック機構の制御を標的としたMEK阻害薬の併用療法

細胞内においてMAPKシグナルは、複雑なフィードバック機構によりその活性が一定になるよう制御されている。これは、*BRAF* V600変異腫瘍において*BRAF*キナーゼ阻害薬投与後にMAPKシグナルの再活性化が認められ

たことから明らかである。我々は、*KRAS*変異肺癌においてMEK阻害薬が単剤で奏効を示せない理由として、MEK阻害薬が受容体型キナーゼの活性を誘導し、MAPKシグナルを再活性化することを明らかにした(図4)(13)。興味深いことに、関与する受容体型キナーゼは細胞の上皮間葉移行状態により異なっており、上皮系マーカー陽性腫瘍ではERBB3、間葉系マーカー陽性腫瘍ではFGFR1がMEK阻害薬投与後に活性化されていた。それぞれの性質を有する*KRAS*変異腫瘍に対し、汎EGFR阻害薬+MEK阻害薬、FGFR阻害薬+MEK阻害薬を投与したところ患者検体由来ゼノグラフトで腫瘍の縮小を認めたことから、上皮間葉移行状態をバイオマーカーとした臨床試験の開始が期待される。

MEK阻害薬と併用効果を示す標的のスクリーニング

RNA干渉法(RNAi)は、短い長さのヘアピン型RNAを導入し、このヘアピン型RNAがタンパクの翻訳情報が入ったメッセンジャーRNA(mRNA)に結合することで、結合したmRNAを分解させる手法である。この方法を用い生体内の各遺伝子について発現抑制を行うことで、MEK阻害薬と併用効果を示す候補遺伝子のスクリーニングが行われている。これまでに、前述のERBB3、FGFR1以外にもBcl-xLがMEK阻害薬の感受性を亢進する分子として報告されている。

MEK阻害薬とBcl-xL阻害薬の併用療法

セルメチニブの感受性を増強する分子の探索のためshRNAスクリーニングを行った結果、Bcl-xLが同定された。MEK阻害薬によるERKシグナルの抑制は、アポトーシス誘導タンパクであるBIMの発現を上昇させるが、*KRAS*変異腫瘍では抗アポトーシスタンパクであるBcl-xLの発現が上昇しており、アポトーシスを誘導することができないことが知られている。実際、*KRAS*変異細胞株に対しBcl-xLタンパクの発現を抑制した後にセルメチニブを投与したところ、アポトーシスが誘導された。この報告をもとにトラメチニブとBcl-xL阻害薬であるabt-263の併用第Ib/II相試験が開始された。しかし、Bcl-xLは血小板の維持に必要なタンパクであることから、abt-263の投与は血小板減少を誘導し、併用療法の臨床開発は難航している。

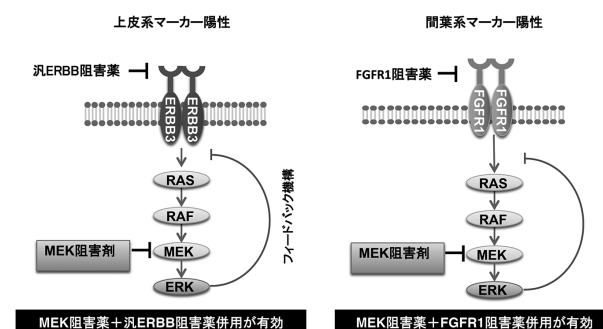


図4. *KRAS*変異肺癌における上皮間葉移行状態に応じた個別化治療

4. Synthetic lethal screen

近年薬剤開発ではsynthetic lethal screenの手法が用いられることがある。たとえば、分子Aの発現抑制もしくは活性阻害が、KRAS野生型の細胞には影響を与えず、KRAS変異が存在する時にのみ細胞死が誘導されたとする。このような場合にKRASとAとはsynthetic lethalityを示すと定義される。この分子Aを標的とすれば、正常細胞 (KRAS野生型細胞) には無毒であり、KRAS変異細胞は死滅する事から理想的な治療標的と考えられる。KRAS野生型と変異型の細胞株を用いRNAiスクリーニングが行われ、複数の標的分子が同定されている。この方法の問題点としては、RNAiではヘアピンRNAが単一のmRNAを標的とするようデザインされているものの、実際には複数のmRNAを標的とする事がしばしば認められる (オフターゲット効果)。その場合、スクリーニングにより見出された標的が真の標的ではない事が起こりうる。またRNAiではタンパクの発現が抑制されるのに対し、低分子化合物は標的タンパクの発現ではなく活性を抑制することがほとんどであることから、RNAiで標的分子が判明した場合でも実際に薬剤を開発することが困難なケースも考えられる。

おわりに

KRASおよびBRAFはMAPKパスウェイに位置するタンパクであるが、それぞれの変異腫瘍に対する治療戦略は対照的でもある。BRAF V600変異腫瘍は、変異BRAFのキナーゼ活性を低分子化合物により抑制する事が可能であり、また下流シグナルがMEK-ERKシグナルに比較的限定されている事より、治療開発の戦略が比較的立てやすい。しかし、がん種によりフィードバック機構を介したMAPKシグナルの再活性化が認められており、発生源母地に応じた治療開発が必要である。一方、KRAS変異腫瘍については、変異KRASの直接阻害が困難であり、また多数の下流シグナルを活性化している事から下流分子をターゲットとした治療開発も難航している。その中でBRAF変異腫瘍に用いられたフィードバック機構の抑制によるMAPKシグナルの完全な遮断は、KRAS変異腫瘍でも有効性が示唆されており、今後の展開が期待される。KRAS、BRAF変異腫瘍の治療は、基礎研究の成果をもとにした分子標的治療を行う時が近づいていると思われるが、臨床試験などにより得られた知見をもとに治療の最適化をしていく努力が必要であると考えられる。

謝 辞

執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会雑誌編集委員長の井関尚一教授ならびに関係の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 455-67.
2. McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* 2014; 15: 323-32.
3. Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP, et al. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov* 2012; 2: 227-35.
4. Prahallad A, Sun C, Huang SD, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 2012; 483: 100-U46.
5. Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, Dominguez JM, Knauf JA, Viale A, Sherman EJ, et al. Relief of feedback inhibition of HER3 transcription by RAF and MEK inhibitors attenuates their antitumor effects in BRAF-mutant thyroid carcinomas. *Cancer Discov* 2013; 3: 520-33.
6. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 2013; 19: 1401-9.
7. Ascierto PA, McArthur GA, Dreno B, Atkinson V, Liszkay G, Di Giacomo AM, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1248-60.
8. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, Saintigny P, Lee JJ, Blumenschein GR, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 228-39.
9. Lito P, Saborowski A, Yue J, Solomon M, Joseph E, Gadal S, et al. Disruption of CRAF-mediated MEK activation is required for effective MEK inhibition in KRAS mutant tumors. *Cancer Cell* 2014; 25: 697-710.
10. Blumenschein GR, Jr., Smit EF, Planchard D, Kim DW, Cadranel J, De Pas T, et al. A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib (GSK1120212) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) dagger. *Ann Oncol* 2015; 26: 894-901.
11. Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 2008; 14: 1351-6.
12. Ebi H, Faber AC, Engelman JA, Yano S. Not just gRASping at flaws: finding vulnerabilities to develop novel therapies for treating KRAS mutant cancers. *Cancer Sci* 2014; 105: 499-505.
13. Kitai H, Ebi H, Tomida S, Floros KV, Kotani H, Adachi Y, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Defines Feedback Activation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling Induced by MEK Inhibition in KRAS-Mutant Lung Cancer. *Cancer Discov* 2016; 6: 754-69.